

特表平9-508525

(43) 公表日 平成9年(1997)9月2日

(51) Int.Cl. ⁸	識別記号	庁内整理番号	F I	
C 1 2 Q 1/68		7823-4B	C 1 2 Q 1/68	A
G 0 1 N 33/53		0276-2J	G 0 1 N 33/53	M
33/533		0276-2J	33/533	
33/566		0276-2J	33/566	
33/58		0276-2J	33/58	A
審査請求 有 予備審査請求 有 (全 31 頁)				

(21) 出願番号 特願平7-520679
 (86) (22) 出願日 平成7年(1995)1月30日
 (85) 翻訳文提出日 平成8年(1996)8月1日
 (86) 国際出願番号 PCT/US95/01205
 (87) 国際公開番号 WO95/21266
 (87) 国際公開日 平成7年(1995)8月10日
 (31) 優先権主張番号 08/189,924
 (32) 優先日 1994年2月1日
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

(71) 出願人 ザ リージェンツ オブ ザ ユニバーシ
 ティ オブ カリフォルニア
 アメリカ合衆国, カリフォルニア 94720
 -1620, パークレー, シェタック アベニ
 ュ 2150, スイート 510, オフィス オ
 ブ テクノロジー ライセンシング
 (72) 発明者 マシース, リチャード エー.
 アメリカ合衆国, カリフォルニア 94530,
 エル セリト, コントラ コスタ ドライ
 ブ 1265
 (74) 代理人 弁理士 石田 敬 (外3名)

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 エネルギー転移連結の色素によりラベルされたプローブ

(57) 【要約】

ドナー及び受容体色素分子の対を担持する蛍光ラベルの組を含んで成る組成物が提供されており、前記組成物は、単一の波長でドナーの効果的な励起及び異なった波長で前記個々の対における受容体からの発光のために企画されている。異なったドナー-受容体対を有する異なった分子は、与えられた対におけるドナーと受容体との間の距離を変えることによって、分離条件下で実質的に同じ移動性を有するように変性され得る。特に、蛍光組成物は、核酸の配列決定においてラベルとして使用される。

Best Available Copy

【特許請求の範囲】

1. 注目の少なくとも2種の構成成分を検出するために異なる蛍光ラベルを用いて複数成分の混合物中の構成成分を同定し、そして検出するための方法であって、前記ラベルが、

(1) 主鎖に結合されるドナー-受容体蛍光対を有し、ここで前記ドナーから前記受容体への効果的なエネルギー転移が生ずるものであり；そして

(2) 前記個々のラベルが実質的に同じ波長で吸光し、そして異なる波長で発光すること、

によって特徴づけられており；

前記複数成分の混合物の異なる成分に異なるラベルを結合し；

前記受容体の吸光波長において共通の光源により照射することにより前記ラベルされた個々の成分を検出し、そして前記個々のラベルの蛍光を検出することを含んで成る方法。

2. 前記ドナーが350～800nmの波長範囲で光を吸収し、そして前記受容体が450～1000nmの波長範囲で光を発する請求の範囲第1項記載の方法。

3. 前記受容体-ドナー対が9-フェニルキサントレンである請求の範囲第2項記載の方法。

4. 注目の少なくとも2種の構成成分を検出するために異なる蛍光ラベルを用いて複数成分の混合物中の構成成分を同定し、そして検出するための方法であって、前記ラベルが、

(1) オリゴヌクレオチド鎖に結合されたドナー-受容体蛍光対を有し、ここで前記ドナーから前記受容体への効果的なエネルギー転移が生ずるものであり；そして

(2) 前記個々のラベルが実質的に同じ波長で吸光し、そして異なる波長で発光する、

ことによって特徴づけられており；

前記複数成分の混合物の異なる成分に異なるラベルを結合し；

前記受容体の吸光波長において共通の光源により照射することにより前記ラベ

ルされた個々の成分を検出し、そして前記個々のラベルの蛍光を検出することを含んで成る方法。

5. 前記ドナーが 350～800nmの波長範囲で光を吸収し、そして前記受容体が 450～1000nmの波長範囲で光を発する請求の範囲第4項記載の方法。

6. 前記受容体-ドナー対が9-フェニルキサンテンである請求の範囲第5項記載の方法。

7. 複数成分の混合物の構成成分を分離するための方法であって、注目の個々の異なる成分が異なるラベルによりラベルされ、前記ラベルが、

(1) オリゴヌクレオチド鎖に結合されたドナー-受容体蛍光対を有し、ここで前記ドナーから前記受容体への効果的なエネルギー転移が生ずるものであり；

(2) 前記個々のラベルが実質的に同じ波長で吸光し、そして異なった波長で発光し；そして

(3) 前記個々の異なるラベルが、前記オリゴヌクレオチド鎖にそって前記ドナー-受容体対のスペーサーを変えることの結果として前記分離において実質的に同じ移動性を有する、

ことによって特徴づけられており、

前記複数成分の混合物の異なる成分に異なるラベルを結合し；

前記成分を個々の画分に分離し；そして

前記受容体の吸光波長において共通の光源により照することによ

り前記ラベルされた個々の成分を検出し、そして前記個々のラベルの蛍光を検出することを含んで成る方法。

8. 前記分離が電気泳動によるものである請求の範囲第7項記載の方法。

9. 前記ドナーが 350～800nmの波長範囲で光を吸収し、そして前記受容体が 450～1000nmの波長範囲で光を発する請求の範囲第7項記載の方法。

10. 前記受容体-ドナー対が9-フェニルキサンテンである請求の範囲第9項記載の方法。

11. 一本鎖核酸をコピーするためのプライマー及び特定のヌクレオチドで前記コピーに起因する鎖を終結するためのジデオキシヌクレオチドを用いて核酸配列

を配列決定するための方法であって、

配列決定されるべき核酸フラグメントを、プライマーに結合する前記フラグメントの5' 側配列を含んで成るベクターでクローニングし；

異なる反応容器において、前記プライマー、dNTP及び少量の異なる1種のジデオキシヌクレオチドの存在下でDNAポリメラーゼにより前記フラグメントをコピーし；そして

一本鎖DNAフラグメントの得られる混合物を分離し、そしてゲル上に存在するバンドにより配列を決定することを含んで成り、

ここで、(1)前記プライマー結合配列に対して相補的な核酸鎖に結合される受容体ドナー蛍光対を有し、ここで前記ドナーが前記受容体の蛍光のために前記受容体にエネルギーを効果的に転移し、(2)前記個々のプライマーが実質的に同じ波長で吸光し、そして異なった波長で発光し；そして(3)前記個々のプライマーが、前記核酸鎖にそって前記ドナー-受容体対の空間及び蛍光団を変えることに起因する、前記分離において実質的に同じ移動性を有する

ことにより特徴づけられるプライマーを用いることを特徴とする方法。

12. 前記受容体ドナー蛍光対のメンバーの1つが前記プライマーの5' 末端に結合される請求の範囲第11項記載の方法。

13. 異なった受容体ドナー対を有する4種のプライマーが存在する請求の範囲第11項記載の方法。

14. 前記受容体ドナー蛍光対が10よりも多くないヌクレオチドにより分離される請求の範囲第11項記載の方法。

15. 少なくとも2つの受容体ドナー蛍光対がキサンテン化合物である請求の範囲第11項記載の方法。

16. 前記キサンテン化合物がフルオレセイン及びローダミンを含んで成る請求の範囲第15項記載の方法。

17. 少なくとも2種の蛍光化合物を含んで成るキットであって、前記個々の蛍光化合物が、

(1) 主鎖に結合された受容体ドナー蛍光対を有し、ここで前記ドナーが前

記受容体の蛍光のために前記受容体にエネルギーを効果的に転移し；（２）個々のラベルが実質的に同じ波長で吸光し、そして異なった波長で発光し；そして（３）個々のラベルが、前記主鎖にそって前記ドナー受容体対の空間を変えることに起因する、前記分離において実質的に同じ移動性を有することを特徴とするキット。

18. 前記主鎖が核酸鎖であり、そして前記受容体ドナー蛍光対が約10個よりも多くないヌクレオチドにより分離される請求の範囲第17項記載のキット。

19. 前記ドナーが 350～ 800の波長範囲で光を吸光し、そして前記受容体が 450～1000の波長範囲で光を発する請求の範囲第17項記載のキット。

20. 少なくとも2つの受容体ドナー蛍光対がキサンテン化合物である請求の範囲第19項記載のキット。

21. 前記キサンテン化合物がフルオレセイン又はローダミンである請求の範囲第20項記載のキット。

【発明の詳細な説明】

エネルギー転移連結の色素によりラベルされたプローブ

技術分野

本発明の分野は蛍光標識及びそれらの使用に関する。

背景

混合物の構成成分を同定し、そして定量するための需要が増々増大している。混合物の複雑性が高まるほど、存在する多くの成分を同時に検出できる興味が高まる。この情況の例として、DNA配列決定が存在し、この場合、多くの個別の波長で蛍光シグナル発光を提供しながら、単一の波長でレーザー源により1～4種の蛍光標識された成分を効果的に励起することが望ましい。この情況においては、異なったラベルは、それらが結合される配列の電気泳動移動性に悪影響を及ぼすべきではない。

現在、自動化されたDNA配列決定のために使用される次の4種の方法が存在する：(1) DNAフラグメントが1つの蛍光団によりラベルされ、そして次に、そのフラグメントが隣接する配列決定レーンで実験され (Ansorge et al., *Nucleic Acids Res.* 15, 4593-4602(1987))；(2) DNAフラグメントが4種の異なった蛍光団によりラベルされ、そしてすべてのフラグメントが電気泳動的に分離され、そして単一のレーンで検出され (Smith et al., *Nature* 321, 674-679(1986))；(3) 終結反応における個々のジデオキシヌクレオシドが異なった蛍光団によりラベルされ、そして4組のフラグメントが同じレーンにおいて実験され (Prober et al., *Science* 238, 336-341(1987))；あるいは(4) DNAフラグメントの組が2種の異

なった蛍光団によりラベルされ、そしてDNA配列が色素比を伴ってコードされる (Huang et al., *Anal. Chem.* 64, 2149-2154(1992))。

それらの技法のすべてはかなりの欠点を有する。方法1は、移動性におけるレーンからレーンの変動及び低い処理量の潜在的な問題を有する。方法2及び3は、4種の色素が1つのレーザー源により十分に励起され、そしてそれらが明確に異なった発光スペクトルを有することを必要とする。実際、単一のレーザーによ

り効果的に励起され得、そして十分に分離された蛍光シグナルを発光する複数の色素を見出すことはひじょうに困難である。

特有の赤色シフトされた発光スペクトルを有する色素を選択できるので、それらの吸光最大値もまた、赤色に移動し、そしてすべての色素は同じレーザー源によりもはや効果的に励起され得ない。また、より異なった色素が選択されるので、色素がラベルされた分子の同じ移動性シフトを引き起こすようなすべての色素を選択することはより困難になる。

従って、多くの構成成分が同じシステム及び一回の実施で決定され得るように、サンプルの多重化を可能にする改良された方法を提供することが実質的な興味の対象である。また、個々のラベルが、共通する波長で強い吸光性を有し、蛍光のために高い収量を有し、発光の大きなストークスシフトを有し、種々の発光が個別であり、そしてラベルが同じ移動性シフトを導びくことが望まれる。単一色素により分子を単純にラベルすることによってそれらの矛盾する目的を達成することは困難である。

発明の要約

本発明は、多くの蛍光ラベルを用いて混合物を分析するための組

成物及び方法を提供する。ラベルを生ぜしめるためには、蛍光団の対又は種類が主鎖、特に核酸主鎖に結合され、ここで前記種類のメンバーの1つがほぼ同じ波長で励起される。エネルギー転移の現象を開発することによって、前記個々の種類の他のメンバーが検出的に異なった波長で発光することが見出された。ドナー及び受容体発色団との間の距離の範囲が、効果的なエネルギー転移を確保するために選択される。さらに、結合して使用されるラベルが別のシステムにおいてほぼ同じ移動性を有するように選択される。これは、蛍光団の種類の複数のメンバー間の距離を変えることによりラベルされた存在物の移動性を変え、そして同じ移動性を有するラベルを選択することによって達成される。本発明は特に配列決定に適用され、ここで蛍光団がユニバーサルプライマー又は他のプライマー及び異なったジデオキシヌクレオシドのために使用される異なった蛍光団組合せに結合され得る。ラベルの組合せのキットもまた提供される。

図面の簡単な説明

図 1 は、1 × TBE における FAM-3-TAM の吸光及び発光スペクトルのグラフである。

図 2 は、FAM-3-TAM の CE エレクトロフェログラムである。サンプルは 488nm の励起を有する典型的な細管電気泳動 DNA 配列決定条件により分析された。緑の痕跡は緑のチャンネルに検出される蛍光シグナルであり (525nm)、そして赤の痕跡は赤のチャンネルに検出される蛍光シグナルである (590nm)。両チャンネルは同時に検出される。

図 3 は、1 × TBE における FAM-4-ROX の吸光及び発光スペクトルのグラフである。

図 4 は、FAM-4-ROX の CE エレクトロフェログラムである。サン

ルは、488nm の励起を有する典型的な細管電気泳動 DNA 配列決定条件により分析される。緑の痕跡は緑のチャンネルに検出される蛍光シグナルであり (525nm)、そして赤の痕跡は赤のチャンネルに検出される蛍光シグナルである (590nm)。両チャンネルは同時に検出される。

図 5 は、FAM-4-ROX 及び ROX プライマーの CE エレクトロフェログラムである。同じ濃度での 2 種のプライマーが 80% ホルムアミドにおいて一緒に混合され、そして細管中に注入された。蛍光シグナルが 476nm での励起を伴って緑及び赤のチャンネルにおいて同時に検出された。

図 6 は、ドナーと受容体との間の距離に対しての移動性の依存性を示す、FAM-3-ROX、FAM-4-ROX 及び FAM-10-ROX 混合物の CE エレクトロフェログラムである。サンプルは、488nm の励起を有する典型的な細管電気泳動 DNA 配列決定条件により分析される。

図 7 は、M13mp18A フラグメント DNA サンプルに対しての異なった色素プライマーの移動シフトの比較である。

特定の態様の記載

新規蛍光ラベル、そのラベルの組合せ、及び多くの成分の分離を包含する分離システムへのそれらの使用が提供される。特に、蛍光ラベルは、複数対の蛍光団

を含んで成り、その1種を除いて、蛍光団は同じであり、オーバーラップするスペクトルを有する異なった蛍光団を含み、ここでドナー発光が受容体吸光とオーバーラップし、その結果、励起された蛍光団から他の対のメンバーへのエネルギー転移が存在する。励起された蛍光団が実際に蛍光を発することは必須ではなく、励起された蛍光団がその励起エネルギーを効果的に吸収でき、そしてそれを発光性蛍光団に効果的に転移することで十分である。

蛍光団の異なった種類におけるドナー蛍光団は、同じであっても又は異なっても良いが、しかし狭いバンド幅の単一光源、特にレーザー源により効果的に励起され得るべきである。ドナー蛍光団は、有意な吸光性、すなわち、お互い20nm以内、普通10nm以内、より普通には5nm以内で、吸収最大値(absorption maxima)の少なくとも約10%、好ましくは少なくとも約20%の吸光性を有するであろう。発光性又は受容性蛍光団は、ドナー蛍光団からのエネルギーを受け、そして光を発することができるように選択され、それらは明確且つ検出できるほど異なるであろう。従って、異なったラベルが結合されている混合物の成分間を区別することができるであろう。通常、ラベルは、少なくとも10nm、好ましくは少なくとも15nm及びより好ましくは少なくとも20nmだけ分離された発光最大値(emission maxima)で発光するであろう。

通常、ドナー蛍光団は、約350～800nmの範囲で、より通常には約350～600nm又は500～750nmの範囲で吸光し、そして受容体蛍光団は、約450～1000nmの範囲で、通常約450～800nmの範囲で光を発するであろう。続いて論ずるように、一対よりも多くの吸収性分子を有することができ、その結果、3種又はそれ以上の分子を有することができ、ここで、吸光と観察される発光との間での波長の差異を高度に増加させるために、エネルギーはより高い波長で1つの分子から次の分子に転移される。

2種の蛍光団が、主鎖又は鎖、通常重合鎖により連結され、ここで前記2種の蛍光団間の距離は変えられ得る。ラベルの企画の背後にある物理学は、ドナーから受容体への光学的励起の転移は $1/R^6$ （ここでRは2種の蛍光団間の距離である）に依存するということである。従って、前記距離は、良く知られたFoerst

er機構を通してドナーから受容体への効果的なエネルギー転移を提供するように

選択されるべきである。従って、2種の蛍光団を分離する鎖における原子の数により決定されるような、2種の蛍光団間の距離は、鎖の性質に従って変えられ得る。種々の鎖又は主鎖、たとえば核酸、DNA及びRNAの両者、修飾された核酸、たとえば酸素が硫黄、炭素又は窒素により置換されているもの、ホスフェートがスルフェート又はカルボキシレート等により置換されているもの、ポリペプチド、多糖類、段階的に付加され得る種々の基、たとえば二官能基、たとえばハロアミン、又は同様のものが使用され得る。蛍光団は、適当であれば種々の構築ブロックの適切な官能価により置換され得、ここで蛍光団はラベルの形成の間、その構築ブロック上に存在し、又は適切であれば、続いて付加され得る。種々の従来の化学が、2種の蛍光団間に適切な空間が得られることを確保するために使用され得る。

ラベル（蛍光団＋それらが結合される主鎖）の分子量は一般的に、少なくとも約250Dal（ダルトン）でありそして約5,000Dalよりも高くなく、通常、約2,000Dalよりも高くないであろう。蛍光団の分子量は一般的に約250～1,000Dalの範囲であり、ここで一緒に使用されるべき異なったラベル上の受容体－ドナー対の分子量は通常、約20%以上、異ならないであろう。蛍光団は、中央部で鎖に、両末端で鎖に、又は一端で鎖に及び内部部位で他の鎖に結合され得る。蛍光団は、類似する化学物質の種類、たとえばシアニン色素、キサンテン又は同様のものからであるように選択される。従って、同じ化学物質の種類からのドナー、同じ化学物質の種類からの個々のドナー－受容体対又は同じ化学物質の種類からの個々の受容体を有することができる。

本発明のラベルは、種々の分離技法、たとえば電気泳動、クロマトグラフィー又は同様のものに特に適用され得、ここで最適化され

た分光特性、高い感受性及び分析される成分の移動性向に対してのラベルの比較できる影響を有することが望まれる。特に、電気泳動、たとえばゲル、細管、等の電気泳動が興味の対象である。クロマトグラフィー技法の中には、HPLC、アフ

イニティークロマトグラフィー、薄層クロマトグラフィー、紙クロマトグラフィー及び同様のものがある。

2種の蛍光団間の空間はラベルの移動性に影響を及ぼすであろうことが見出された。従って、異なった色素対を使用することができ、そして良好なエネルギー転移を可能にする範囲内で、異なった色素対間の距離を変えることによって、ラベルのために実質的に一定した移動性を提供することができる。その移動性は特定の空間に関係されず、その結果、特定のラベルの移動性に対するその空間の効果を経験的に決定できるであろう。しかしながら、ラベルにおける蛍光団の空間の柔軟性のために、異なった空間及び異なった色素対を有する数種類の異なったラベルを合成することによって、強く且つ明確な発光及び実質的に共通する移動性を有する、通常の励起を共有する蛍光ラベルの種類を提供することができる。通常、移動性は、特別な分離に使用される場合、お互い約20%以下、好ましくはお互い約10%以下、及びより好ましくは、お互い約5%以内で異なるであろう。移動性は通常、単独でラベルの分離を、又は特定の分離に関連する共通の分子、たとえば配列決定に興味ある場合、適切な大きさの核酸分子に結合されるラベルの分離を実施することによって決定され得る。

広範囲の種類の蛍光色素が使用れ得る。それらの色素は、種々のクラスに分けられ、ここで色素の組合せが同じクラス内に又は異なったクラス間に使用され得る。それらのクラス内には、色素、たとえばキサンテン色素、たとえばフルオレセイン及びローダミン、ク

マリン、たとえばウンベリフェロン、ベンズイミド色素、たとえばHuechest 332 58、フェナントリジン色素、たとえば Texas Red、及びエチジウム色素、アクリジン色素、シアニン色素、たとえばチアゾールオレンジ、チアゾールブルー、Cy 5及びCyfr、カルバゾニル色素、フェノキサジン色素、ポルフィリン色素、キノリン色素、又は同様のものが包含される。従って、色素は紫外線、可視又は赤外線範囲で吸収することができる。多くの場合、蛍光分子は、約2 KDa以下、一般的には約 1.5 KDa以下の分子量を有するであろう。

エネルギードナーは、所望する励起波長で強い吸光度係数、望ましくは約 10^4

以上、好ましくは約 $10^5 \text{ cm}^{-1} \text{ M}^{-1}$ 以上の吸光度係数を有すべきである。ドナーの励起最大値及び受容体（蛍光体）の発光最大値は、少なくとも15nm又はそれ以上分離されるであろう。ドナー発色団の発光スペクトルと受容体発色団の吸光性スペクトルとの間のスペクトルオーバーラップ全体及び発色団間の距離は、ドナーから受容体へのエネルギー転移の効率が20%～100%の範囲になるように存在するであろう。

鎖中の原子の数に基づいてのドナー及び受容体の分離は、主鎖の性質、硬質か又は柔軟か、たとえば環構造か又は非環状構造か、又は同様の性質に依存して変化するであろう。一般的に、鎖中の原子の数（環構造中の原子は鎖に包含される環の片側のまわりの原子の最低数として計数されるであろう）は、約200以下、通常約150以下、好ましくは約100以下であり、ここで主鎖の性質がドナーと受容体との間のエネルギー転移の効率に影響を及ぼすであろう。

ほとんどの場合、蛍光団の対が使用されるが、4種までの異なった、通常、3種よりも多くない異なった、同じ主鎖に結合される蛍光団が使用され得る状況が存在する。多くの蛍光団を用いることによって、ストークスシフトを非常に拡張することができ、その結果

、可視波長範囲で励起することができ、そして通常、約1000nm以下、より通常には約900nm以下の赤外線波長範囲で発光することができる。赤外線波長範囲での光の検出は多くの利点を有する。なぜならば、励起光に起因するラマン及びレイリー光からの障害を受けやすすくないであろうからである。移動性の恒常性を維持するためには、大きなストークスシフトのために異なった蛍光団を有するラベル上の蛍光団の数を調和するために多数の同じ蛍光団を有するラベル上に同じ数の蛍光団を用いることができる。

本発明は、核酸鎖に特に適用でき、ここで前記核酸鎖は配列決定、特にサイジングのためのポリメラーゼ鎖反応、又はプライマーが核酸拡張のために使用され、そして特定のラベルに関する混合物の種々の成分間を区別したい場合の他のシステムにおいて、プライマーとして使用される。たとえば、異なった対の蛍光団が配列決定の間、拡張のために使用される異なった個々のジデオキシヌクレオシ

ドのために使用される配列決定においては、ユニバーサルプライマーが使用され得る。

官能化される多数のヌクレオシドが利用でき、そしてポリヌクレオチドの合成に使用され得る。対象の核酸ラベルを合成することによって、蛍光団が存在する特定部位を定義できる。市販の合成機が従来の手法に従って使用され得、その結果、適切な空間を有する蛍光団の対を有するいずれかの配列が達成され得る。

異なったプライマーが PCR に使用される場合、個々のプライマーが本発明に従ってラベルされ、その結果、異なったプライマーの個々に対して相補的な標的配列の存在を容易に検出することができる。使用される他の用途は、特定の抗体を用いてのアイソザイムの同定、異なった多糖類を用いてのレクチンの同定、及び同様の同定を包含する。

すでに指摘されたように、本発明のラベルは特に配列決定に使用される。たとえば、プライマーへの 2 種の蛍光団の結合により修飾されている、ユニバーサルプライマーのいずれかの 1 種であり得るユニバーサルプライマーが調製され得る。従って、種々の商業的プライマー、たとえば pUC/M13, λ gt10, λ gt11, 及び同様のものからのプライマーが利用できる。Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd ed., CSHL, 1989, Section 13 を参照のこと。DNA 配列が、配列決定されるべき配列に連結されるプライマー配列を有する適切なベクターでクローン化される。異なった 2', 3' ddNTP が使用され、その結果、終結が、鎖拡張に存在する特定の ddNTP に依存して、異なった部位で生じる。本発明のプライマーを用いることによって、個々の ddNTP は特定のラベルに関連するであろう。クレンジングフラグメントによる拡張の後、その得られるフラグメントは、電気泳動による単一のレーンにおいて、又は電気泳動による単一の細管において分離され、ここでラベルの蛍光により終結ヌクレオチドを検出することができる。

本発明のラベルを免疫複合体と共に使用することもでき、ここでリガンド又は受容体、たとえば抗体が異なった複合体又は複合体のメンバーを検出するためにラベルされ得る。リガンドが分離方法において同じ移動性向を有する場合、1 又

は複数のそのようなリガンドの存在を検出するために、分離における組成のオーバーラップが存在する場合でさえ、検出できるように、異なった抗体が異なった波長で蛍光を発する異なったラベルによりラベルされ得る。

ラベルの組合せ、通常少なくとも2種のラベルを有するキットが提供される。個々のラベルは、通常比較しうる主鎖と共に受容体-ドナー対を有し、ここでラベルは使用される分離方法において比較しうる移動性を与えるために主鎖にそって分離される。一緒に使用

されるグループにおける個々のラベルは、ほぼ同じ波長で吸光し、そして異なった波長で発光する。グループにおける個々のラベルは、主鎖にそっての異なった蛍光団の配置の変動の結果として、分離方法における移動性に対してほぼ同じ効果を有するであろう。

キットは、マッチする約6種までの、通常約4種までの異なったラベルを有するが、しかし2〜6種の異なったラベルを有する、複数組のマッチするラベルを有することができる。

核酸主鎖を含んで成るラベルが特に興味の対象であり、ここで前記ラベルは一般的に、少なくとも約10個のヌクレオチドそして約50個よりも多くないヌクレオチド、通常約30個よりも多くないヌクレオチドを有するであろう。ラベルは、相補的配列にハイブリダイズするヌクレオチド上に存在し、又はそれらのヌクレオチドから分離され得る。蛍光団は通常、鎖に約2〜20個、通常4〜16個の原子を有する便利な結合アームによりヌクレオチドに連結されるであろう。前記鎖は多くの官能基、特に非-オキシカルボニル、より特定にはエステル及びアミド、アミノ、オキシ及び同様のものを有する。鎖は、通常、炭素、窒素、酸素、硫黄又は同様のものを鎖に含んで成る、脂肪族、脂環式、芳香族、複素環式炭化水素、又はそれらの組合せであり得る。

完全な核酸配列は、5'プライマー配列に対して相補的であり、又はその配列の3'部分に対してのみ相補的であり得る。通常、コピーされるべき配列に対して相補的である、少なくとも約4個のヌクレオチド、より通常には少なくとも約5個のヌクレオチドが存在するであろう。プライマーは、コピーされるべき鎖の

3' 端でプライマー配列を有する適切なプラスミドにおいてコピーされるべき配列、及び少量の適切な ddNTPと共に添加されるdNTPと共に組合される。拡張の後、DNAは単離され、そして分離のためにゲル又は細管

に移される。

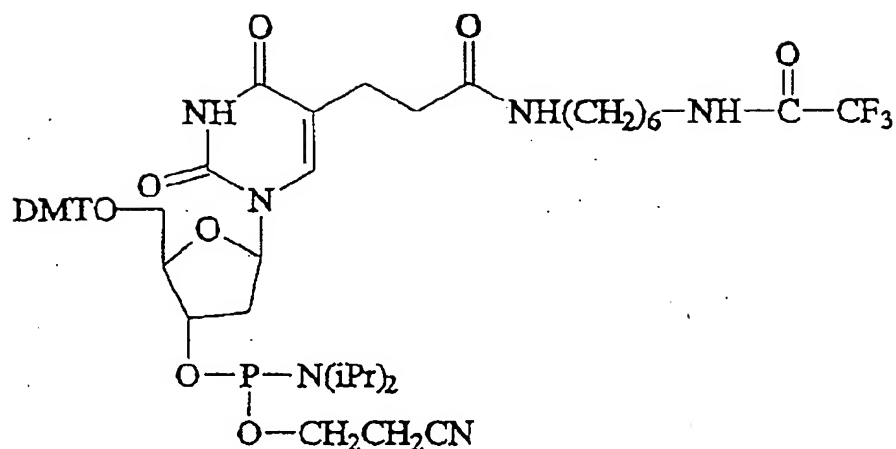
使用されるキットは少なくとも2種の対象ラベルを有し、これはドナー分子のために実質的に同じ吸光度、別個の発光スペクトル及び実質的に同じ移動性を有することによってマッチするであろう。一般的に、一本鎖核酸のためには、分離は蛍光団間で約1～15個、より通常には1～12個、好ましくは約2～10個のヌクレオシドからであろう。

次の例は例示的であって、本願発明を限定するものではない。

実験

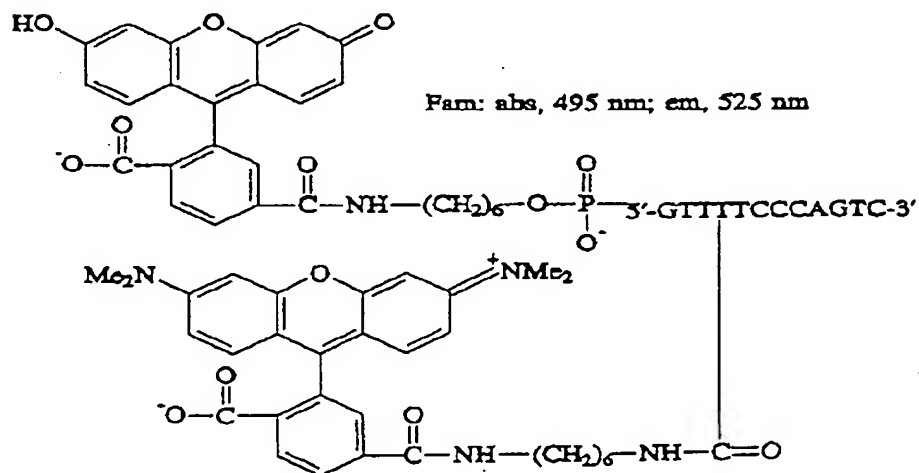
遺伝子分析のための、エネルギー転移蛍光色素により標識されたオリゴヌクレオチドラベルの設計及び合成

M13ユニバーサルプライマーから選択された、配列5' -GTTTTCCAGTC-3' を有するデオキシオリゴヌクレオチド(12塩基の長さ)を、異なった距離により分離されたドナー-受容体蛍光団対により合成した。特に、前記12-マーは、C-5位置で第一アミンリンカーアームを有する、下記の5' ジメトキシトリチル-5-[N-(トリフルオロアセチルアミノヘキシ)-3-アクリルイミド]-2'-デオキシウリジン、3'-[(2-シアノエチル)-(N,N-ジイソプロピル)]-ホスホラミジット(Amino-Modifier C6dT)(構造体1)の使用により導入される修飾された塩基を含む:



構造体 1. Amino-Modifier C6 dT

ドナー色素はオリゴマーの5'側に結合され、そして受容体色素は修飾されたT上の第1アミン基に結合される。ドナーと受容体との間の距離は、オリゴマー上の修飾されたTの位置を変えることによって変えられた。プライマーはD-N-A（ここでAはドナーであり、Aは受容体であり、そしてNはDとAとの間の塩基の数である）とに示される。調製されるすべてのプライマーにおいては、DはApplied Biosystems Inc.（“ABI”）製の色素 FAM、すなわちフルオレセイン誘導体であり、Aは ABI色素 TAM又は ROX（両者ともロダミン誘導体である）である。代表的な例として、FAM-3-TAMの構造体下記に示される（構造体2）：



構造体 2. FAM-3-TAM

本明細書に記載されるエネルギー転移アプローチの利点は、（1）488nmで励起する場合、大きなストークスシフト及びより強い蛍光シグナルが生成され得、

そして(2)プライマーの移動性が同じ移動性を達成するためにドナーと受容体との間の距離を変えることにより調整され得ることである。FAM-3-TAMの可視スペクトルはFAM(495nm)及びTAM(560nm)の両者の吸光性を有するが、しかしながら、488nmでの励起に関しては、ほぼすべての発光は579nmで最大であるTから発生する(図1)。これはFAMからTAMへの効果的な蛍光エネルギー転移を示す。これはまた、細管電気泳動(CE)カラム下にプライマーを負荷し、そして赤及び緑色のチャンネルに検出することによっても見られ得る。FAM-及びTAM-ラベルされたプライマーにより、ほぼすべての発光が赤色のチャンネル(590nm)に見られる(図2)、これはドナーFAMからのエネルギーが受容体TAMにほとんど完全に転移され、91nmのストークスシフトを生成することを示唆する。単一のピークの観察は、プライマーが純粋であることを示す。同じ結果が、114nmの大きなストークスシフトを付与するFAM-4

-ROXに関して見られる(図3及び4)。単一の色素によりラベルされたプライマーに比較してエネルギー転移プライマーの蛍光シグナルの増強が見られ、ここではFAM-4-ROXの濃度と同じ濃度(UVにより測定される)でのABI ROXプライマーが同じ細管に注入されている。FAM-4-ROXのその得られる蛍光シグナルは、ROXプライマーのシグナルよりも10倍以上高いことが見出された(図5)。

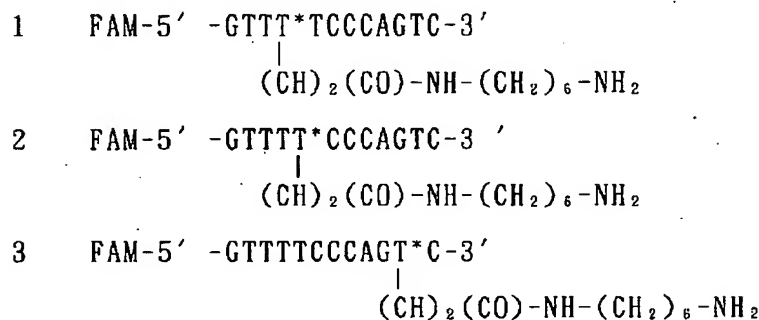
DNA配列決定へのドナー受容体蛍光団によりラベルされたプライマーの好結果をもたらす適用のためには、プライマーはDNAフラグメントの同じ移動性シフトを生成し、そして明確な蛍光シグナルを示すことが不可欠である。プライマーの移動性はドナーと受容体との間の距離に依存することが見出された(図6)。FAM-4-ROX, FAM-3-ROX及びFAM-10-ROXが細管から分離され、そして赤及び緑色のチャンネルに検出された。FAM-10-ROXに関しては、色素間の距離の増加がエネルギー転移の量を減じ、2つのチャンネルにほとんど等しいシグナルをもたらす。低下した相対的な緑色のシグナルにより示されるように、分離距離が減じられるにつれて、エネルギー転移の量は増加する。FAM-3-ROX及びFAM-4-ROXの両者は卓越したエネルギー転移を示すが、しかしそれらの移動性は明白に異なっており、すなわち距離を変えることにより移動性シフトを調整する可能性を提供する。明確に

異なった発光スペクトルを有する2種のプライマーの移動性の正確な整合を得るために、FAM-3-FAM, FAM-4-FAM及びFAM-10-FAMもまた調製された。調製されたプライマー (FAM-N-FAM, FAM-N-TAM, FAM-N-ROX) のライブラリー間で、Sequenase 2を用いてFAM-10-FAM及びFAM-3-ROXにより生成される、Aで終結する配列決定フラグメントがひじょうに類似する移動性シフトを有する(図7) ことが見出されており、これは DNA配列の分析のための可能性を示す。FAM-10-FAM及びFAM-3-ROXの発光は、それぞれ 525nm及び 605

nmに存在する。水のラマンシグナルは、それらの2種の波長において、とるにたらない。従って、シグナル：ノイズの比は劇的に高められる。

I. 修飾されたT及び5' 位での FAMラベルを含む12-マーのオリゴヌクレオチドの調製

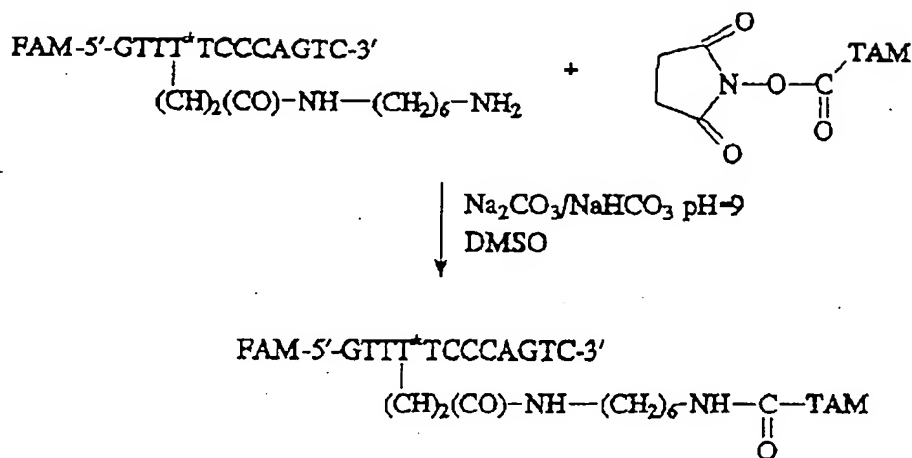
次の3種のプライマーを、0.2 μ モル規模でABI Model394 DNA合成機上で調製した：



アミノリンカーアームを含む修飾された塩基T*が、Amino-Modifier C6 dTホスホラミジット (Glen Research) を用いることにより、定義された位置に導入され、そして FAMが合成の最後の段階で6-FAM アミジット(ABI)を用いて導入された。塩基配列が完結された後、オリゴヌクレオチドを、1mlの濃 NH_4OH により固体支持体(CPG)から切断した。塩基上のアミノ保護基 (A, G, C及びT*) を、55℃で4時間、 NH_4OH 溶液を加熱することによって除去した。細管電気泳動分析は、オリゴマーが約80%の純度であり、そしてそれらが次の色素カップリング段階に直接使用されることを示唆した。

II. オリゴマー1, 2及び3のアミノリンカーアームへの第2蛍光色素の結合

代表的な例として、オリゴマー 1 に第 2 色素(TAM)を結合せしめる反応スキームが下記に示される：



FAM-3-TAM

0.5Mの $\text{Na}_2\text{CO}_3/\text{NaHCO}_3$ 緩衝液40 μ l中、FAM-ラベルのオリゴヌクレオチド（1，2及び3）を、12 μ lのDMSO中、約150倍過剰量の TAM-NHSエステル又は ROX-NHSエステル又は FAM-NHSエステルと共に室温で一晩インキュベートした。反応しなかった色素を、Sephadex G-25カラム上でのサイズ排除クロマトグラフィーにより除去した。次に、2種の色素ラベルのオリゴヌクレオチドを、6M尿素-TBE，20%アクリルアミドゲル電気泳動(40cm \times 0.8cm)により精製した。純粋なプライマーをゲルから除去し、そしてOligonucleotide Purification Cartridgeにより脱塩した。プライマーの純度は、細管ゲルクロマトグラフィーにより99%以上であることが示された。

III. FAM-3-ROX及びFAM-10-FAMによる DNA配列決定フラグメントの調製

Aで終結されるM13mp18の DNA配列決定フラグメントを、Sequenase2.0(USB)を用いて製造した。次の2種のアニーリング溶液を600 μ lのバイアルに調製した：(1)10 μ lの反応緩衝液、40 μ lのM13mp18一本鎖DNA及び6 μ lのFAM-3-ROX；(2)6 μ lの反

応緩衝液、20 μ lのM13mp18一本鎖DNA及び3 μ lのFAM-10-FAM。個々のバイアルを65℃で5分間加熱し、そして室温に30分間冷却し、そして次に、20分間、氷

上に置き、短いプライマーが鋳型に完全にハイブリダイズしたことを確認した。
3 μ l の DTT, 20 μ l の dda 終結混合物及び 12 μ l の希釈された Sequenase 2.0 を、氷上の個々のバイアルに添加した。その反応混合物を 20℃ で 20 分間、及び次に、37℃ でさらに 20 分間インキュベートした。反応を、50mM の EDTA 10 μ l, 4 M の NH_4OH 40 μ l 及び 95% EtOH 300 μ l の添加により停止した。前記溶液を十分に混合し、そして次に、氷上に 20 分間、置いた。フラグメントを 75% 冷 EtOH により 2 度脱塩し、真空下で乾燥せしめ、そして 95% (v/v) ホルムアミド 4 μ l 及び 50mM の EDTA に溶解した。サンプルを 3 分間、加熱し、DNA を変性し、そして次に、細管電気泳動装置上へのサンプルの注入まで、氷上に置いた。電気運動学的注入は、10KV で 30 秒間実施された。

実質的に同じ励起一吸光性及び移動性を有すると共に、異なった発光波長及び高い発光量子量を付与するために、関連する組成物、たとえば 2 種の蛍光団により官能化されたポリヌクレオチドを調製できることは、上記結果から明らかである。この手段においては、組成物の混合物は独立して分析され、ここで異なった成分が異なった蛍光発光バンドを有するラベルにより特異的にラベルされ得る。さらに、前記組成物は容易に調製され得、広範囲の種類の内容物に使用され得、そして増強された蛍光性質及び良好な安定性を有する。

引用されるすべての出版物及び特許出願は、それぞれ個々の出版物又は特許出願が引用により組込まれていることを特異的且つ個々に示されているかのように、引用により本明細書に組込まれている。

前述の発明は一層の理解のために例示的且つ例的にいくつか詳細に記載されて来たけれども、一定の変更及び修飾が本発明の範囲内で行なわれ得ることは明らかである。

【図1】

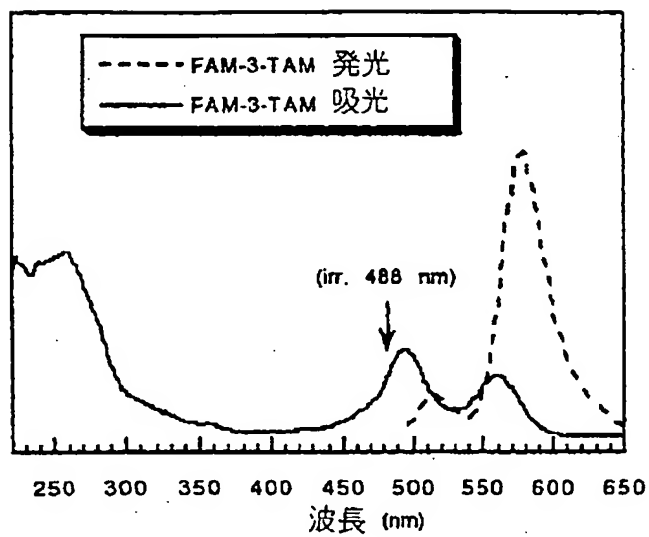


Fig. 1

【図2】

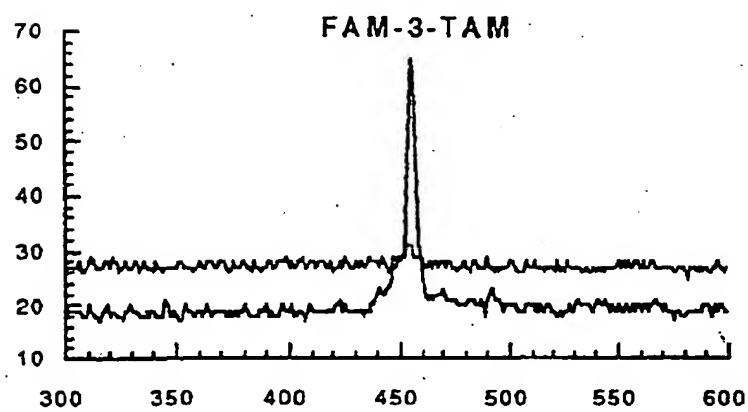


Fig. 2

【図3】

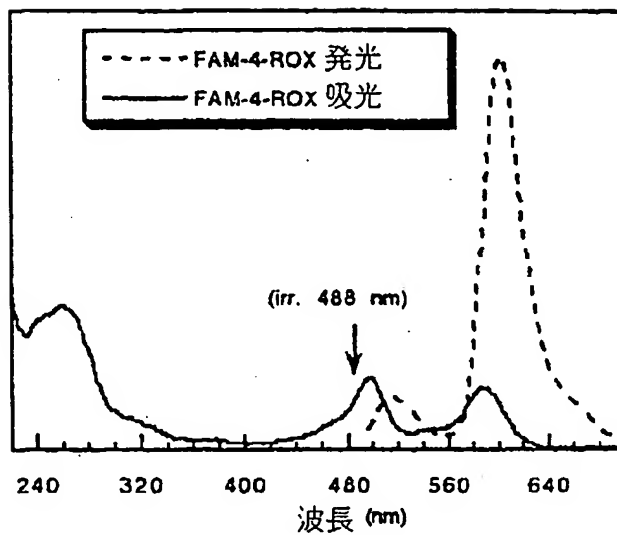


Fig. 3

【図4】

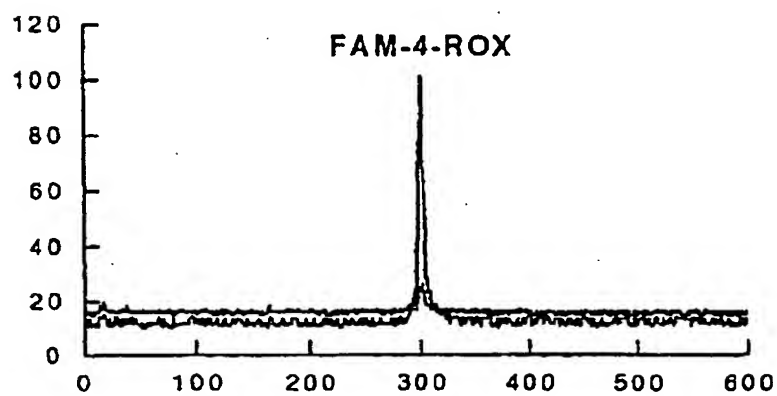


Fig. 4

【図5】

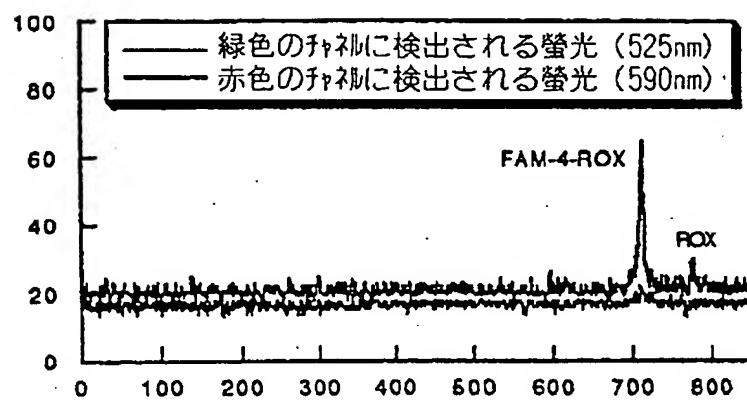


Fig. 5

【図6】

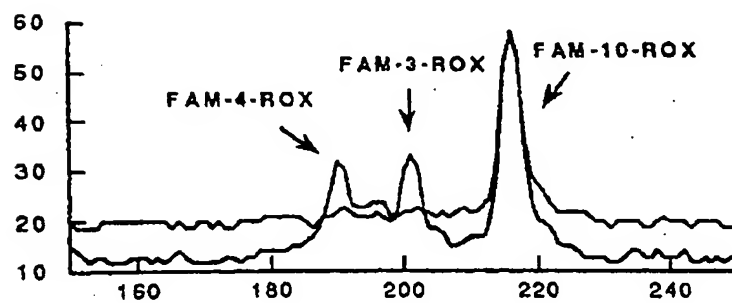


Fig. 6

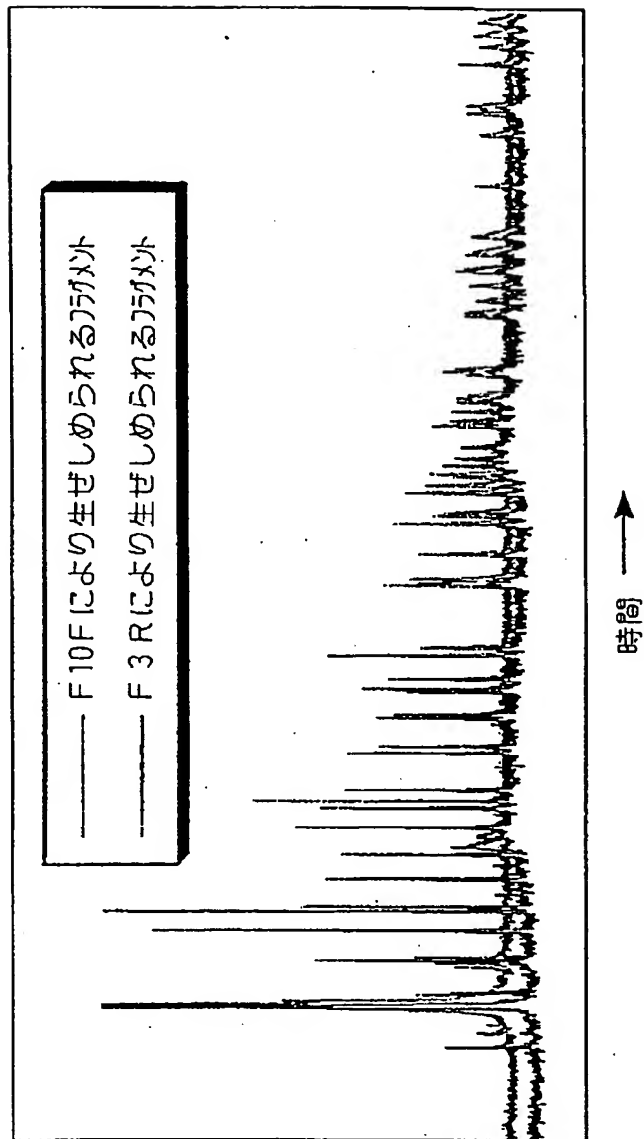


Fig. 7

【手続補正書】特許法第184条の8

【提出日】1995年11月30日

【補正内容】

請求の範囲

1. 注目の少なくとも2種の構成成分を検出するために異なる蛍光ラベルを用いて複数成分の混合物中の構成成分を同定し、そして検出するための方法であつて、前記個々のラベルが、

(1) 主鎖に結合されるドナー-受容体蛍光対を有し、ここで前記ドナーから前記受容体への効果的なエネルギー転移が生ずるものであり；そして

(2) 前記個々のラベルが実質的に同じ波長で吸光し、そして異なる波長で発光する、

ことによって特徴づけられており；

前記複数成分の混合物の異なった成分に異なった発光波長を有する異なったラベルを結合し；

前記ドナーの吸光波長において共通の光源により照射することにより前記ラベルされた個々の成分を検出し、そして前記個々のラベルの蛍光を検出することを含んで成る方法。

2. 前記ドナー-受容体対の個々のドナーが 350～800nmの波長範囲で光を吸収し、そして前記ドナー-受容体対の受容体が 450～1000nmの波長範囲で光を発する請求の範囲第1項記載の方法。

3. 前記ドナー-受容体対が9-フェニルキサンテンである請求の範囲第2項記載の方法。

4. 注目の少なくとも2種の構成成分を検出するために異なる蛍光ラベルを用いて複数成分の混合物中の構成成分を同定し、そして検出するための方法であつて、前記個々のラベルが、

(1) オリゴヌクレオチド鎖に結合されたドナー-受容体蛍光対を有し、ここで前記ドナーから前記受容体への効果的なエネルギー転移が生ずるものであり；そして

(2) 前記個々のラベルが実質的に同じ波長で吸光し、そして異なった波長で発光する、

ことによって特徴づけられており、

前記複数成分の混合物の異なる成分に異なる発光波長を有する異なるラベルを結合し、

前記ドナーの吸光波長において共通の光源により照射することにより前記ラベルされた個々の成分を検出し、そして前記個々のラベルの蛍光を検出することを含んで成る方法。

5. 前記ドナー-受容体対の個々のドナーが 350～800nmの波長範囲で光を吸収し、そして前記ドナー-受容体対の受容体が 450～1000nmの波長範囲で光を発する請求の範囲第4項記載の方法。

6. 前記ドナー-受容体対が9-フェニルキサンテンである請求の範囲第5項記載の方法。

7. 複数成分の混合物の構成成分を分離するための方法であって、注目の個々の異なる成分が異なるラベルによりラベルされ、前記ラベルが、

(1) オリゴヌクレオチド鎖に結合されたドナー-受容体蛍光対を有し、ここで前記ドナーから前記受容体への効果的なエネルギー転移が生ずるものであり、

(2) 前記個々のラベルが実質的に同じ波長で吸光し、そして異なった波長で発光し、そして

(3) 前記個々の異なるラベルが、前記オリゴヌクレオチド鎖にそって前記ドナー-受容体対のスペーサーを変えることの結果として前記分離において実質的に同じ移動性を有する、

ことによって特徴づけられており、

前記複数成分の混合物の異なる成分に異なる発光波長を有する異なったラベルを結合し、

前記成分を個々の画分に分離し、そして

前記受容体の吸光波長において共通の光源により照射することにより前記ラベルされた個々の成分を検出し、そして前記個々のラベルの蛍光を検出することを含

んで成る方法。

8. 前記分離が電気泳動によるものである請求の範囲第7項記載の方法。

9. 前記ドナー-受容体対の個々のドナーが 350~ 800nmの波長範囲で光を吸収し、そして前記ドナー-受容体対の受容体が 450~1000nmの波長範囲で光を発する請求の範囲第7項記載の方法。

10. 前記ドナー-受容体対が9-フェニルキサンテンである請求の範囲第9項記載の方法。

11. 一本鎖核酸をコピーするためのプライマー及び特定のヌクレオチドで前記コピーに起因する鎖を終結するためのジデオキシヌクレオシドを用いて核酸配列を配列決定するための方法であって、

配列決定されるべき核酸フラグメントを、プライマーに結合する前記フラグメントの5' 側配列を含んで成るベクターでクローニングし、

異なる反応容器において、前記プライマー、dNTP及び少量の異なった1種のジデオキシヌクレオチドの存在下で DNAポリメラーゼにより前記フラグメントをコピーし、そして

一本鎖 DNAフラグメントの得られる混合物を分離し、そしてゲル上に存在するバンドにより配列を決定することを含んで成り、

ここで、(1) 前記プライマー結合配列に対して相補的な核酸鎖に結合されるドナー-受容体蛍光対を有し、ここで前記ドナーが前記受容体の蛍光のために前記受容体にエネルギーを効果的に転移し、(2) 前記個々のプライマーが実質的に同じ波長で吸光し、そして異なった波長で発光し、そして(3) 前記個々のプライマーが、

前記核酸鎖にそって前記ドナー-受容体対の空間及び蛍光団を変えることに起因する、前記分離において実質的に同じ移動性を有することにより特徴づけられるプライマーを用いることを特徴とする方法。

12. 前記ドナー-受容体蛍光対のメンバーの1つが前記プライマーの5' 末端に結合される請求の範囲第11項記載の方法。

13. 異なったドナー-受容体対を有する4種のプライマーが存在し、個々は異

なった発光波長を有することによって異なっている請求の範囲第11項記載の方法

14. 前記ドナー-受容体蛍光対が10よりも多くないヌクレオチドにより分離される請求の範囲第11項記載の方法。

15. 少なくとも2つのドナー-受容体蛍光対がキサンテン化合物である請求の範囲第11項記載の方法。

16. 前記キサンテン化合物がフルオレセイン及びローダミンを含んで成る請求の範囲第15項記載の方法。

17. 少なくとも2種の蛍光化合物を含んで成るキットであって、前記個々の蛍光化合物が、

(1) 主鎖に結合されたドナー-受容体蛍光対を有し、ここで前記ドナーが前記受容体の蛍光のために前記受容体にエネルギーを効果的に転移し；(2) 個々のラベルが実質的に同じ波長で吸光し、そして異なった波長で発光し；そして(3) 個々のラベルが、前記主鎖にそって前記ドナー-受容体対の空間及び蛍光団を変えることに起因する、電気泳動による核酸の分離において実質的に同じ移動性を有することを特徴とするキット。

18. 前記主鎖が核酸鎖であり、そして前記ドナー-受容体蛍光対が約10個よりも多くないヌクレオチドにより分離される請求の範囲第17項記載のキット。

19. 前記ドナー-受容体蛍光対の前記ドナーが 350～800nmの波長範囲で光を吸光し、そして前記ドナー-受容体対の受容体が 450～1000nmの波長範囲で光を発する請求の範囲第17項記載のキット。

20. 少なくとも2つのドナー-受容体蛍光対がキサンテン化合物である請求の範囲第19項記載のキット。

21. 前記キサンテン化合物がフルオレセイン又はローダミンである請求の範囲第20項記載のキット。

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US95/01205

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC(6) : C12Q 1/68

US CL : 435/6

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

U.S. : 252/301.34, 301.35; 428/402; 435/6; 436/518, 528, 529, 531, 800; 536/22.1, 25.3

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

APS, BIOSIS, CAS, BIOTECH ABS, WPI, MEDLINE
search terms: energy, transfer, dye, fluorescent, donor, acceptor

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	US, A, 4,996,143 (HELLER ET AL.) 26 FEBRUARY 1991, SEE ENTIRE DISCLOSURE.	1-21
Y	PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES (USA), VOLUME 85, ISSUED DECEMBER 1988, CARDULLO ET AL., "DETECTION OF NUCLEIC ACID HYBRIDIZATION BY NONRADIATIVE FLUORESCENCE RESONANCE ENERGY TRANSFER", PAGES 8790-8794, SEE ESPECIALLY THE ABSTRACT AND THE FIGURES 1-6.	1-21
Y	US, A, 5,188,934 (MENCHEN ET AL.) 23 FEBRUARY 1993, SEE ESPECIALLY THE ABSTRACT AND CLAIMS 5-18.	1-21

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	T	later documents published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	X	documents of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"E" earlier document published on or after the international filing date	Y	documents of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"I" documents which may throw doubt on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	A	document member of the same patent family
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means		
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed		

Date of the actual completion of the international search

29 MARCH 1995

Date of mailing of the international search report

17 APR 1995

Name and mailing address of the ISA/US
Comptroller of Patents and Trademarks
Box PCT
Washington, D.C. 20231

Facsimile No. (703) 305-3230

Authorized officer

ARDIN MARSCHER

Telephone No. (703) 308-0196

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US95/01205

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	ANNUAL REVIEW OF BIOCHEMISTRY, VOLUME 47, ISSUED 1978, STRYER, "FLUORESCENCE ENERGY TRANSFER AS A SPECTROSCOPIC RULER", PAGES 819-846, SEE ENTIRE DISCLOSURE.	1-21
Y	NATURE, VOLUME 321, ISSUED 12 JUNE 1986, SMITH ET AL., "FLUORESCENCE DETECTION IN AUTOMATED DNA SEQUENCE ANALYSIS", PAGES 674-679, SEE ESPECIALLY THE ABSTRACT AND CHEMISTRY AND INSTRUMENTATION SECTIONS ON PAGES 675-676.	1-21
Y	NUCLEIC ACIDS RESEARCH, VOLUME 13, NUMBER 7, ISSUED 1985, SMITH ET AL., "THE SYNTHESIS OF OLIGONUCLEOTIDES CONTAINING AN ALIPHATIC AMINO GROUP AT THE 5' TERMINUS: SYNTHESIS OF FLUORESCENT DNA PRIMERS FOR USE IN DNA SEQUENCE ANALYSIS", PAGES 2399-2412, SEE THE ENTIRE DISCLOSURE.	1-21
Y	SCIENCE, VOLUME 238, ISSUED 16 OCTOBER 1987, PROBER ET AL., "A SYSTEM FOR RAPID DNA SEQUENCING WITH FLUORESCENT CHAIN-TERMINATING DIDEOXYNUCLEOTIDES", PAGES 336-341, SEE ENTIRE DISCLOSURE.	1-21

Form PCT/ISA/210 (continuation of second sheet)(July 1992)

フロントページの続き

(81)指定国 EP(AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AP(KE, MW, SD, SZ), AM, AT, AU, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, GB, GE, HU, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LK, LR, LT, LU, LV, MD, MG, MN, MW, MX, NL, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SI, SK, TJ, TT, UA, UZ, VN

(72)発明者 グレーザー, アレキサンダー

アメリカ合衆国, カリフォルニア 94563,
オランダ, キヤノン ドライブ 135

(72)発明者 ジュ, ジンギュー

アメリカ合衆国, カリフォルニア 94704,
パークレー, ヒルドブランド 329, デパートメント オブ ケミストリー, ユニバーシティ オブ カリフォルニア

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ BLACK BORDERS
- ☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☒ FADED TEXT OR DRAWING
- ☒ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☒ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☐ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.